

JP2000-247998A

Abstract

VARIANT OF ALPHA 1A ADRENALINE RECEPTOR, MEASURING METHOD
USING THE SAME VARIANT AND THERAPEUTIC AGENT FOR DYSURIA
ACCOMPANYING PROSTATIC HYPERTROPHY
(JP2000247998)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new variant of human .alpha.1A adrenaline receptor, provide a method for measuring inverse agonist activity of .alpha.1A adrenaline receptor antagonist using the variant and obtain a therapeutic agent for dysuria accompanying prostatic hypertrophy containing .alpha.1A adrenaline receptor antagonist substantially not exhibiting inverse agonist activity as an active ingredient.

SOLUTION: This new variant of human .alpha.1A is obtained by substituting alanine of 271th amino acid with threonine. Inverse agonist activity is measured by using increase amount of .alpha.1A adrenaline receptor by medicine treatment in variant expression cell as index. (-)-(R)-1-(3-Hydroxypropyl)-5-[2-[2-(2,2,2

trifluoroethoxy)phenoxy]ethyl]amino] propyl indoline-7-carboxamide and its salt can be exemplified as .alpha.1A adrenaline receptor not exhibiting inverse agonist.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

Priority Details : 1999JP-0051163 19990226

Inventor(s) : MURAMATSU IKUNOBU; TATEMACHI SATOSHI; MURATA SATOSHI; AKIYAMA KATSUYOSHI; TANIGUCHI TAKANOBU

Patent Assignee : KISSEI PHARMACEUTICAL

Orig. Patent Assignee : (A) KISSEI PHARMACEUT CO LTD

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開 2000-247998

(P 2000-247998A)

(43) 公開日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	14/705	C 0 7 K 14/705	4B024
A 6 1 P	13/00	A 6 1 K 31/00	6 1 3 4C086
	43/00		6 4 3 D 4C204
A 6 1 K	31/404	31/40	6 0 7 4H045
// C 0 7 D	209/08	C 0 7 D 209/08	
審査請求 未請求 請求項の数 4		O L	(全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-51163

(22) 出願日 平成11年2月26日(1999.2.26)

(71) 出願人 000104560

キッセイ薬品工業株式会社

長野県松本市芳野19番48号

(72) 発明者 村松 郁延

福井県吉田郡松岡町芝原3丁目18番3号

(72) 発明者 谷口 隆信

福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿2-111-B2-101

(72) 発明者 村田 聡

長野県南安曇郡穂高町大字柏原4509キッセ

イ第三青友寮

(72) 発明者 立道 聡

長野県松本市大村588-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体の変異体、当該変異体を用いた測定方法及び前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤

(57) 【要約】

【目的】 ヒト $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体の新規変異体、当該変異体を用いた $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体アンタゴニストのインバースアゴニスト活性測定方法および実質的にインバースアゴニスト活性を示さない $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体アンタゴニストを有効成分として含有する前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤を提供する。

【構成】 第 271 アミノ酸のアラニンをスレオニンに置換したヒト $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体の新規変異体。インバースアゴニスト活性は当該変異体発現細胞における薬物処置による $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体の増加量を指標として測定する。インバースアゴニスト活性を示さない $\alpha 1 A$ アドレナリン受容体アンタゴニストとしては、(一) $-(R)-1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-[2-[2-[2-(2,2,2-トリフルオロエトキシ)フェノキシ]エチル]アミノ]プロピル]インドリン-7-カルボキサミド$ 及びその塩が例示できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト α_{1A} アドレナリン受容体において第271アミノ酸のアラニンをスレオニンに置換した α_{1A} アドレナリン受容体の変異体。

【請求項2】 請求項1記載の α_{1A} アドレナリン受容体の変異体を用いた α_{1A} アドレナリン受容体アンタゴニストのインバースアゴニスト活性の測定方法。

【請求項3】 請求項2記載の測定方法においてインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} アドレナリン受容体アンタゴニストを有効成分として含有する前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤。

【請求項4】 α_{1A} アドレナリン受容体アンタゴニストが
(一) - (R) - 1 - (3-ヒドロキシプロピル) - 5
- [2 - { [2 - {2 - (2, 2, 2-トリフルオロエ
トキシ) フェノキシ] エチル} アミノ} プロピル] イン
ドリン-7-カルボキサミドまたはその薬理学的に許容
される塩である請求項3記載の前立腺肥大に伴う排尿困
難症治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒト α_{1A} アドレナリン受容体の第271アミノ酸のアラニンをスレオニンに置換した α_{1A} アドレナリン受容体の新規変異体、当該 α_{1A} アドレナリン受容体の変異体を用いた α_{1A} アドレナリン受容体アンタゴニストのインバースアゴニスト活性の測定方法および当該測定方法においてインバースアゴニストを有効成分として含有する前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 α_1 アドレナリン受容体（以下 α_1 - ARという）サブタイプについては、これまでに薬理学的研究および受容体遺伝子のクローニングにより α_{1A} アドレナリン受容体サブタイプ（以下 α_{1A} - ARという）、 α_{1B} アドレナリン受容体サブタイプ（以下 α_{1B} - ARという）および α_{1D} アドレナリン受容体サブタイプの3種のアドレナリン受容体サブタイプの存在が確認されている。

【0003】 種々の動物及びヒトの各種臓器におけるこれらの α_1 - ARサブタイプの局在及び機能について多くの研究がなされ、ヒト前立腺組織には α_{1A} - ARが優位に存在し、 α_{1A} - AR選択的アンタゴニストがノルアドレナリン収縮を最もよく抑制することからヒト前立腺は α_{1A} - ARを介して収縮すると考えられている。また、ヒトの末梢血管は α_{1B} - ARを介して収縮することが報告されている（British Journal of Pharmacology, Vol. 113, pp. 723-728 (1994)）。更に、ヒト大網動脈およびヒト腸間膜動脈も α_{1B} - ARを介するとされている。

【0004】 最近、 α アドレナリン受容体、 β アドレナ

リン受容体、ヒスタミンH受容体を始めとするG蛋白質共役型受容体は、不活性型と活性型がある一定の平衡状態で存在し、活性型のみがプロテインキナーゼCなどの細胞内情報伝達系を介した生理反応を引き起こすことが報告されている。

【0005】 一方、これらの受容体に対するアゴニストおよびアンタゴニストの作用についても研究が行われており、アンタゴニストには不活性型と活性型の平衡状態に影響しないニュートラルアンタゴニストと平衡状態を不活性側に移動させるインバースアゴニストがあり、インバースアゴニスト活性の強いアンタゴニストを長期使用した場合は、一過性に細胞内情報伝達系が抑制された結果、代償性に受容体数が増加することが報告されている。

【0006】 例えば、胃・十二指腸潰瘍治療剤として知られているヒスタミンH₂受容体アンタゴニストのシメチジンやラニチジンはインバースアゴニストであるため、これらヒスタミンH₂受容体アンタゴニストを長期連用するとヒスタミンH₂受容体数が増加し、その結果、耐性発現（作用減弱）や使用中断により胃酸分泌亢進などのリバウンド現象を起こすことが問題点として指摘されている。このように、インバースアゴニストは耐性発現やリバウンド現象により予期せぬ症状を引き起こすため、医薬品として使用するアンタゴニストはニュートラルアンタゴニストが望ましいとして種々の研究がなされている。ヒスタミンH₂受容体の他に β_2 アドレナリン受容体や α_{1B} - ARについても変異体を用いて種々の研究が活発に行われており、アンタゴニストの性質が受容体の活性を左右することが報告されている。（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 93, pp. 6802-6807 (1996); Biochem. J., Vol. 325, pp. 733-739 (1997)）しかしながら、 α_{1A} - ARについてはこれまでニュートラルアンタゴニストかインバースアゴニストであるかを判定する実験手段自体が開発されていなかったため、今まで何ら報告がなされていない。

【0007】 ヒト前立腺の収縮は α_{1A} - ARを介し、ヒト末梢血管の収縮は α_{1B} - ARを介する事が報告されていることより、起立性低血圧などの副作用を軽減するため前立腺肥大症治療剤として選択的 α_{1A} - ARアンタゴニストが開発されているが、当該アンタゴニストがインバースアゴニストの場合は耐性発現による増量を余儀なくされることが懸念される。即ち、各臓器の主要な受容体の活性化状態が異なると、インバースアゴニスト活性を持つアンタゴニストの作用強度が臓器によって変化することが考えられ、場合によっては起立性低血圧などの副作用が強く発現するようになることが懸念される。

【0008】 特に、心臓においても α_{1A} - ARが発現していることが確認されており、 α_1 - AR刺激により心肥大が誘導されることが報告されている。 α_{1A} - ARは細胞内情報伝達経路の一つであるイノシトール1, 4,

5-トリリン酸（以下 IP_3 という）を産生してプロテインキナーゼCを活性化させることが知られており、プロテインキナーゼC活性の亢進が心肥大誘導の一因を担っているものと考えられる。それ故、心筋細胞において α_{1A} -ARが増加すると、心肥大が起こる危険性が增大する。（血管と内皮, Vol. 5, No. 6, pp. 81-86 (1995); 医学のあゆみ, Vol. 172, No. 3, pp. 151-154 (1995); The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 10, pp. 5839-5843 (1996)) 従って、 α_{1A} -ARアンタゴニストとして、インバースアゴニストを使用すると受容体数が増加した場合、心肥大の危険性が增加することが予想される。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、連用による耐性発現を抑え、また心肥大など他の臓器における副作用を回避することのできる前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤を提供することである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明者らは、 α_{1A} -ARに関して鋭意研究を重ねた結果、インバースアゴニストとニュートラルアンタゴニストの判定に適した α_{1A} -AR変異体を確立することができ、その α_{1A} -AR変異体を発現させた Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いる事により、 α_{1A} -ARにおいてもインバースアゴニストとニュートラルアンタゴニストが存在する事を見出した。更に、当該CHO細胞を用いた実験でインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARに対するニュートラルアンタゴニストが前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤として非常に優れた薬剤となり得る事を見出し、本発明を成すに至った。

【0011】本発明者らは、 α_{1A} -ARの平衡状態を活性型優位にすべく研究した結果、野生型 α_{1A} -ARの271番目であるアミノ酸のアラニンのスレオニンに置換した466個のアミノ酸から構成される α_{1A} -AR変異体をCHO細胞に発現させ、細胞内 IP_3 量を測定したところ、野生型に比べ IP_3 量が顕著に上昇しており、活性型が優位である α_{1A} -AR変異体の確立に成功した (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 195, No. 2, pp. 902-909 (1993); FEBS Letters, Vol. 42, pp. 279-283 (1998))。

【0012】更に、本発明者らは、上記 α_{1A} -AR変異体を発現させたCHO細胞を用いて実験することにより、細胞内 IP_3 量を減少させ、その結果として α_{1A} -AR数を増加させるインバースアゴニスト活性を示すアンタゴニストと、細胞内 IP_3 量および α_{1A} -AR数を変化させないニュートラルアンタゴニストを判定する事ができ、医薬品として有用なニュートラルアンタゴニストの開発が可能である事を見出した。

【0013】そして、上記実験でインバースアゴニスト

活性を示さない α_{1A} -ARアンタゴニストは長期投与で耐性を発現せず、しかも心臓において α_{1A} -AR数を変化させず好適な前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤として期待できる事を見出した。

【0014】即ち、本発明者らが確立した活性型が優位にある上記 α_{1A} -AR変異体を発現させたCHO細胞を用いた実験において、 α_{1A} -ARに対して高親和性を示すプラゾシンは細胞内 IP_3 量を30%程度減少させ、その結果 α_{1A} -AR数を約3倍に増加させたのに対し、 α_{1A} -ARに対して高親和性を示す選択的な尿道平滑筋収縮抑制作用を有する排尿困難症治療剤として開発されたインドリン誘導体（特開平6-220015号公報）の中の一化合物である（一）-（R）-1-（3-ヒドロキシプロピル）-5-〔2-〔〔2-（2-（2, 2-トリフルオロエトキシ）フェノキシ）エチル〕アミノ〕プロピル〕インドリン-7-カルボキサミド（以下KMD-3213という）は IP_3 量には影響を与えず、 α_{1A} -AR数も変化させなかった。以上のことから、プラゾシンは α_{1A} -ARに対して強いインバースアゴニスト活性を示すアンタゴニスト（インバースアゴニスト）であり、一方、KMD-3213は α_{1A} -ARに対するインバースアゴニスト活性を示さないニュートラルアンタゴニストであることが確認された。

【0015】次に、本発明者らは、上記 α_{1A} -ARに対するインバースアゴニストであるプラゾシンと α_{1A} -ARに対するニュートラルアンタゴニストであるKMD-3213をラットを用いてインバースアゴニスト活性と耐性に関する相関性を確認すべく各被験薬物を4週間連続経口投与した後、フェニレフリン誘発尿道内圧上昇に対する阻害活性を各被験薬物の静脈内投与により検討したところ、プラゾシンは50%阻害量 (ID_{50} 値) として対照群に比し約1.7倍の高値を示し、耐性を発現したのに対し、KMD-3213は耐性を発現しなかった。

【0016】また、同様にラットを用いて塩酸プラゾシンおよびKMD-3213を2週間連続腹腔内投与して、心臓における α_{1A} -AR発現に対する影響を調べたところ、プラゾシン連続投与群では α_{1A} -AR数は約1.7倍に増加した。一方、KMD-3213連続投与群では α_{1A} -AR数は変化しなかった。

【0017】従って、 α_{1A} -AR変異体発現CHO細胞でインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARに対するニュートラルアンタゴニストは、連続投与によりフェニレフリン誘発尿道内圧上昇の阻害活性を減弱させないため、耐性が生じることなく、また薬物使用中断によるリバウンド現象を示すことがなく、前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤として極めて有用である。

【0018】更に、上記 α_{1A} -ARに対するインバースアゴニスト活性を示さないニュートラルアンタゴニストは、心肥大との関連性が示されている心臓における α_{1A}

ーAR数に関しても何ら影響を示さないことから、薬物使用中の耐性獲得および使用中断によるリバウンド現象など α_{1A} -AR数増加に起因する心臓に対する副作用を回避できる。

【0019】このように、本発明の α_{1A} -AR変異体を用いる事により、このような前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤として有用なインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARに対するニュートラルアンタゴニストを開発することができる。

【0020】本発明において、有効成分として含有されるインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARに対するアンタゴニストとは、全くインバースアゴニスト活性を示さないニュートラルアンタゴニストに限定されるものではなく、466個のアミノ酸から構成される α_{1A} -AR変異体を用いた本発明のインバースアゴニスト活性測定方法におけるプラゾシンによる α_{1A} -AR数の増加量をインバースアゴニスト活性100%とした場合、実質的に α_{1A} -ARに対する影響がないと考えられるインバースアゴニスト活性が概ね30%以下のアンタゴニストであればよく、概ね10%以下のアンタゴニストであれば更に好適である。KMD-3213のインバースアゴニスト活性は0%であり、極めて優れたニュートラルアンタゴニストとして挙げられる。

【0021】また、KMD-3213はSD系ラットでの単回経口投与による毒性試験において、50%致死量(LD₅₀値)が雌雄共に878mg/kgであり、特に重篤な副作用もなく、安全な化合物である。

【0022】従って、インバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARアンタゴニスト、例えば、KMD-3213またはその薬理学的に許容される塩を活性成分として含有させることにより、連用による耐性発現を抑え、また使用中断後の心肥大などの他の臓器における副作用を回避することのできる極めて好適な前立腺肥大に伴う排尿困難症治療剤を得る事が出来る。

【0023】本発明の排尿困難症治療剤の活性成分の一つであるKMD-3213およびその薬理学的に許容される塩は公知化合物であり、文献記載の方法により製造することができる(特開平6-220015号公報)。

【0024】本発明の排尿困難症治療剤において活性成分として含有される化合物は遊離体のままで使用してもよく、薬理学的に許容される塩として使用してもよい。例えば、KMD-3213の薬理学的に許容される塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸、2,5-ジメチルベンゼンスルホン酸、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホン酸、(+)-カンファースルホン酸、(-)-カンファースルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、1-ブタンスルホン酸、フマル酸、グルタミ

ン酸、アスパラギン酸等とのモノまたはジ酸付加塩等を挙げることが出来る。

【0025】また、本発明の排尿困難症治療剤において活性成分として含有される化合物には、上記の塩の他、水和物やエタノール等の医薬品として許容される溶媒との溶媒和物も含まれる。

【0026】本発明の医薬品組成物を実際の治療に用いる場合、用法に応じ種々の剤型のもが使用される。このような剤型としては例えば、散剤、顆粒剤、細粒剤、ドライシロップ剤、錠剤、カプセル剤などの経口投与剤、注射剤、貼付剤あるいは坐剤などの非経口投与剤を挙げることができる。

【0027】これらの医薬品組成物は、その剤型に応じ調剤学上使用される手法により、適当な賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、希釈剤、緩衝剤、等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤などの医薬品添加物と適宜混合または希釈・溶解し、常法に従い調剤することにより製造することができる。

【0028】例えば、散剤は活性成分、例えば、KMD-3213またはその薬理学的に許容される塩に、必要に応じ、適当な賦形剤、滑沢剤等を加えよく混和して散剤とする。

【0029】錠剤は、活性成分、例えば、KMD-3213またはその薬理学的に許容される塩に、必要に応じ、適当な賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤等を加え常法に従い打錠して錠剤とする。錠剤はまた必要に応じ、コーティングを施し、フィルムコート錠、糖衣錠等にすることができる。

【0030】カプセル剤は、活性成分、例えば、KMD-3213またはその薬理学的に許容される塩に、必要に応じ、適当な賦形剤、滑沢剤等を加えよく混和した後、適当なカプセルに充填してカプセル剤とする。また、常法により顆粒あるいは細粒とした後あるいは分散剤、乳化剤、安定化剤、溶解補助剤などを加え液状とした後充填してもよい。

【0031】また、本製剤は徐放性製剤として投与してもよい。通常の徐放性製剤として錠剤もしくは顆粒中に徐放性基剤を配合したマトリックス型徐放性製剤、あるいは常法により得た錠剤または顆粒またはマトリックス型徐放性製剤を徐放性基剤によりコーティングした皮膜制御型徐放性製剤として経口投与することができる。徐放性基剤としては、硬化油、ステアリアルアルコール、セチルアルコール、パラフィン、脂肪酸モノグリセリン等のワックス、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、酢酸ビニル樹脂、アクリル酸エチルメタクリル酸メチルコポリマー、アミノアルキルメタアクリレートコポリマー、メタアクリル酸コポリマーなどを挙げることが出来る。

【0032】本発明の医薬品組成物を実際の治療に用い

る場合、その活性成分であるインバースアゴニスト活性を示さない α_{1A} -ARアンタゴニストの投与量は対象となる患者の性別、年齢、体重、症状の度合などによって適宜決定されるが、例えば活性成分としてKMD-3213またはその薬理学的に許容される塩を用いる場合、経口的に、概ね成人1日当たり0.1~100mg、非経口的に、概ね成人1日当たり0.01~100mgの範囲内で投与される。

【0033】

【実施例】本発明の内容を以下の試験例および処方例でさらに詳細に説明するが、本発明はその内容に限定されるものではない。

【0034】試験例1

α_{1A} -AR変異体発現CHO細胞における細胞内IP₃の定量及び α_{1A} -AR数の測定

①目的

ヒト α_{1A} -AR変異体（ヒト α_{1A} -ARの第3細胞内ループにある第271番目のアラニンをスレオニンに置換した466個のアミノ酸から構成される受容体）を発現したCHO細胞を用いて、塩酸プラゾシンおよびKMD-3213の α_{1A} -AR活性に対する影響を細胞内IP₃量および受容体発現量を指標として検討した。

【0035】②方法

ヒト前立腺cDNAライブラリーに対してウシ α_{1A} -AR遺伝子（333bp）をプローブとしてスクリーニングを行い、全長1.5kbpのヒト α_{1A} -AR cDNA断片（5'非翻訳領域7bpおよび3'非翻訳領域≤100bpを含む）を単離した。また、 α_{1A} -AR変異体はmodified site-specific PCR法を用いて、得られたヒト α_{1A} -AR（野生型）の第271アミノ酸のアラニンをスレオニンに置換することにより作製した。 α_{1A} -AR遺伝子は制限酵素EcoRIを用いて哺乳類発現ベクターpCR3に挿入し、リポフェクトアミン（GIBCO社製）を用いてCHO細胞に導入した。細胞は、500μg/mlのG-418の存在下、αMEM（10%ウシ胎児血清、100units/mlペニシリンG、100μg/ml硫酸ストレプトマイシンを含む）を用いて37℃で培養し、恒常的に α_{1A} -ARを発現する細胞を得た。

【0036】上述した方法により α_{1A} -ARを発現させたCHO細胞を各被験薬物（ 10^{-7} M）存在下で37℃で16時間培養し、培養終了30分前に細胞をPBSで洗浄し、血清除去培地に交換した。その後、CHO細胞に0.8M過塩素酸処理を施し、氷上で30分間放置後、60mMのHEPES、60mMのEDTAを含む4M水酸化ナトリウムで中和し、遠心分離を行い沈渣を除去した。得られた細胞抽出液を用いてInositol-1, 4, 5-trisphosphate [³H] Radioreceptor Assay Kit（NEN社製）により細胞内IP₃量を測定した。一方、受

容体発現量を検討する実験においては、 α_{1A} -AR変異体を発現させたCHO細胞を各被験薬物（ 10^{-12} ~ 10^{-7} M）の存在下で48時間37℃で培養した。その後、Assay buffer（Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, pH7.4）にて細胞を回収し、Sonicatorを用いて破碎し、80000xgで30分間遠心分離後、得られた沈渣をAssay bufferで懸濁して膜分画とした。膜分画（10μg protein/tube）を[³H]-プラゾシン（ 10 ~ 2000 pM）共存下45分間30℃でインキュベーション後、Cell harvester（M-30T, Brandel社製）を用いて膜分画をGF/Cフィルター（Whatman社製）上に回収し、50mMのTris-HCl buffer（pH7.4）で数回洗浄後、液体シンチレーションカウンターを用いて結合量を測定した。非特異的結合は1μM塩酸タムスロシン存在下での結合とした。得られた実験結果を非線形近似プログラムPRISM（登録商標）（Graphpad Software社製）を用いて解析し、受容体量を算出した。

【0037】③結果

野生型と比べて変異体を発現した細胞は細胞内IP₃量が上昇しており、 α_{1A} -AR変異体では活性型が優位であることが確認された。このような α_{1A} -AR変異体を用いた実験において、塩酸プラゾシン処置は細胞内IP₃量を減少させ、受容体発現量を増加させたが、KMD-3213処置では細胞内IP₃量および受容体量いずれにおいても影響が認められなかった。また、KMD-3213は塩酸プラゾシンのIP₃減少作用に拮抗した。このことから、 α_{1A} -ARにおいてプラゾシンはインバースアゴニストとして、KMD-3213はニュートラルアンタゴニストとして作用していることが判明した。

【0038】

【図1】

【0039】

【図2】

【0040】試験例2

ラットの尿道内圧に対する α_1 -ARアンタゴニストの影響

①目的

SD系雄性ラットを用いたフェニレフリン誘発尿道内圧上昇に対するKMD-3213及び塩酸プラゾシンの抑制作用の程度を各被験薬物非投与群と4週間連続投与群で比較検討した。

【0041】②方法

最低6日間の検疫後、KMD-3213及び塩酸プラゾシンを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁または溶解し、各300μg/kgの用量で28日間連続経口投与した。また、それぞれの被験薬物投与群（KMD-3213連続投与群、プラゾシン連続投与群）に対して

0. 5%メチルセルロース水溶液のみを投与した対照群を設けた。最終投薬日の2日後、ラットをウレタン

(1. 25 g/kg, 腹腔内投与)で麻酔した。下腹部切開を施し、尿道に沿って恥骨結合部を切開した。膀胱頂部より生理的食塩水を満たしたカニューレ(ポリエチレンチューブNo. 5, ヒビキ社製)を挿入し、先端部を前立腺部尿道に位置するよう留置した。さらに、膀胱頸部および遠位尿道部を結紮した。尿道内圧はカニューレ後端に接続した圧力トランスデューサー(DTX-X, オメガ株式会社製)および変換器増幅ユニット(1829, 日本電気三栄株式会社製)を介して測定し、レコーダー(RECTI-HORIZ-8K又はRT-3200N, 日本電気三栄株式会社製)上に記録した。尿道内圧上昇は、塩酸フェニレフリン(30 μg/kg)を左大腿部静脈よりシリンジポンプ(Model 100, 室町機械株式会社製)を用いて36 ml/hrの速度で注入する事により惹起した。

【0042】KMD-3213連続投与群では静脈内投与のKMD-3213の尿道内圧上昇抑制作用、プラゾシン連続投与群では静脈内投与の塩酸プラゾシンの尿道内圧上昇抑制作用を検討した。被験薬物を右大腿静脈よ

*り用量増加法により1時間ごとに投与(KMD-3213: 0. 3, 1, 3および10 μg/kg; 塩酸プラゾシン: 1, 3, 10および30 μg/kg)し、各用量投与5分後に尿道内圧上昇を惹起して被験薬物投与前の尿道内圧上昇値と比較した。これより、各投与用量の尿道内圧上昇抑制率を算出し、その用量-抑制曲線よりID₅₀値(被験薬物投与前の尿道内圧上昇反応を50%抑制する被験薬物の投与用量)を算出して、それぞれの対照群におけるID₅₀値と比較した。尚、KMD-3213連続投与群およびその対照群はKMD-3213二臭化水素酸塩を乳酸リンゲル液に溶解して静脈内投与し、プラゾシン連続投与群およびその対照群は塩酸プラゾシンを生理食塩水に溶解して静脈内投与した。

【0043】③結果

α_{1A}-ARに対するニュートラルアンタゴニストであるKMD-3213連続投与群のID₅₀値は対照群に比し増加は示さなかった。一方、α_{1A}-ARに対するインバーサゴニストであるプラゾシン連続投与群では対照群に比し約1. 7倍の高値を示した。

【0044】

【表1】

連続投与薬物	ID ₅₀ 値(μg/kg, 静脈内投与)	
	KMD-3213	塩酸プラゾシン
対 照 (薬物投与なし)	1. 39	4. 86
KMD-3213 (300 μg/kg)	0. 92	—
塩酸プラゾシン (300 μg/kg)	—	8. 08

【0045】試験例3

ラット心臓のα_{1A}-AR発現に対するα₁-ARアンタゴニストの影響

①目的

ラット心臓におけるα_{1A}-AR発現量に対する塩酸プラゾシンおよびKMD-3213投与の影響を被験薬物非投与群と2週間連続投与群で比較検討した。

【0046】②方法

Wistar系雄性ラット(7週齢)に各被験薬物2 mg/kgを14日間腹腔内投与した。投与終了から24時間後、心臓を摘出し、buffer(Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH7. 4)内で細断後、Polytronを用いてホモジナイズし、ガーゼでろ過した。ろ過した上清は80000 x gで30分間遠心分離後、沈渣をAssay buffer(Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH7. 4)に懸濁して再び80000 x gで30分間遠心分離し、得られた沈渣をAssay bufferで再懸濁して膜分画とした。〔³H〕-K

MD-3213(10~2000 pM)および膜分画(200 μg protein/tube)を30℃で45時間インキュベーション後、Cell harvester(M-30T, Brandel社製)を用いて膜分画をGF/Cフィルター(Whatman社製)上に回収し、50 mMのTris-HCl buffer(pH7. 4)で数回洗浄後、液体シンチレーションカウンターを用いて結合量を測定した。非特異的結合は1 μM塩酸タムスロシン存在下での結合とした。得られた実験結果を非線形近似プログラムPRISM(登録商標)(Graphpad Software社製)を用いて解析し、α_{1A}-AR数を算出した。

【0047】③結果

塩酸プラゾシン2週間連続投与はラット心臓におけるα_{1A}-AR数を1. 7倍に増加させたのに対し、KMD-3213連続投与はα_{1A}-AR数に影響を与えなかった。

【0048】

【表2】

	対照群	KMD-3213 連続投与群	プラazosin 連続投与群
α_{1A} -AR 数 (fmol/mg protein)	41.3	43.8	69.6

【0049】試験例4

単回投与毒性試験

①方法

1 群当たり5週齢のSD系ラット、雌雄各5匹を用い、それぞれに400、800および1600mg/kgを10
単回経口投与した後、14日間観察した。

【0050】②結果

死亡率は、雌雄とも400mg/kg投与群で5例中0、800mg/kg投与群で5例中3例、1600mg/kg投与群で5例中4例であり、50%致死量(LD₅₀)は雌雄とも878mg/kg、最小致死量は雌雄とも800mg/kgであった。

【0051】処方例

以下に処方例の1例として、活性成分としてKMD-3213を含有させたカプセル剤の1処方例を示す。20

【0052】

KMD-3213 1.0mg含有カプセル剤
処方

KMD-3213	1.0g
D-マンニトール	46.0g
コーンスターチ	2.5g

ステアリン酸マグネシウム 0.5g

合計 50.0g

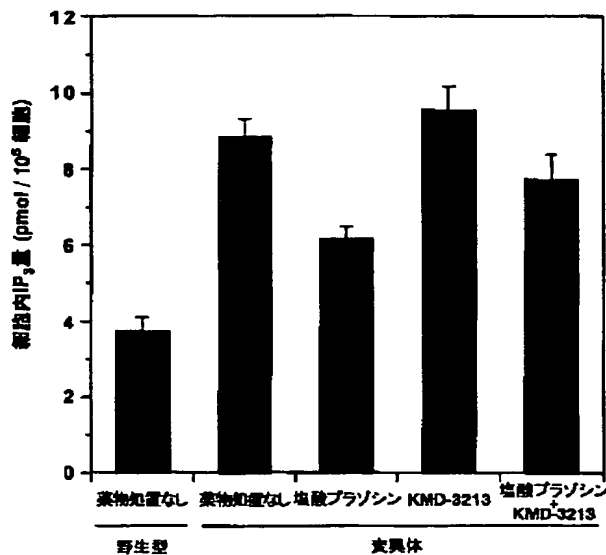
以上をよく混和し、1カプセル中KMD-3213を1.0mg含有するように充填し、KMD-3213の1.0mg含有カプセル剤を製する。

【図面の簡単な説明】

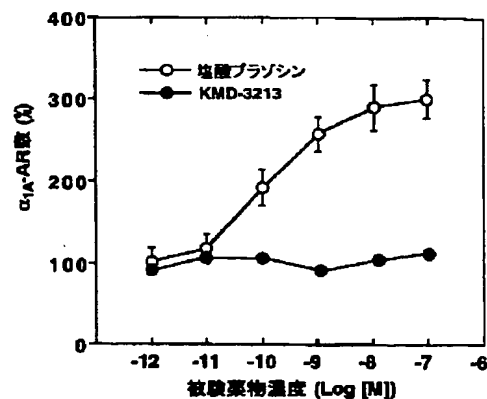
【図1】 α_{1A} -AR (変異体および野生型) 発現CHO細胞の薬物非処置群および α_{1A} -AR変異体発現細胞の各被験薬物投与群 (単独または併用) における細胞内IP₃量を示したグラフである。縦軸は細胞内IP₃量 (pmol/10⁶細胞) を示す。横軸は使用した α_{1A} -ARおよび使用薬物の種類を示す。

【図2】 α_{1A} -AR変異体発現CHO細胞における受容体発現量に対する各被験薬物の濃度-反応曲線を示したグラフである。縦軸は薬物非処置時の受容体数を100%とした場合の薬物処置後の α_{1A} -AR数の変化 (%) を示す。横軸は被験薬物処置濃度 (Log [M]) を示す。尚、-○-は塩酸プラazosinを示し、-●-はKMD-3213を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

(72) 発明者 秋山 克良

長野県南安曇郡穂高町大字穂高1090-2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA02
EA04 GA13 GA18 HA01
4C086 AA01 AA02 BC10 MA01 MA04
NA05 NA06 NA14 ZA81 ZC42
ZC78
4C204 BB01 CB03 DB01 EB01 FB17
GB13 GB22
4H045 AA10 AA30 CA44 DA50 EA26
EA50 FA72 FA74 GA15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.